

Sipos Ferenc

Új PNS oligomerek és P-királis mononukleotidok szintézise és szerkezetvizsgálata

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Témavezető:

Sági Gyula, C.Sc.



MTA Kémiai Kutatóközpont, Biomolekuláris Kémiai Intézet

ELTE-TTK Kémia Doktori Iskola

Vezető: Inzelt György, D.Sc.

Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia program

Programvezető: Horváth István Tamás, D.Sc.

2009

Bevezetés és célkitűzések

Az oligodeoxinukleotidok (ODN) természetes pirimidin bázisait helyettesítő C5-alkinil- vagy C5-heteroaril-analóg egységek beépítése növeli az ODN:DNS illetve ODN:RNS duplexek stabilitását. A stabilitás növekedéséért a szomszédos bázisok közötti vertikális $\pi-\pi$ kölcsönhatás, az ún. stacking erősödése felelős. A peptid-nukleinsavak (PNS) a természetes DNS ill. RNS cukor-foszfát gerince helyett N-(2-aminoetil)-glicin gerincet tartalmaznak. A PNS:DNS és különösen a PNS:RNS duplexek jóval stabilabbak, mint a megfelelő DNS hasonmások. Ezenkívül a PNS teljesen rezisztens peptidázokkal és proteázokkal szemben.

A természetes dinukleotidok NMR adatainak analízise alapján ismert, hogy a C3'-O3' kötés körüli konformációs egyensúly jól jellemezhető a $^3J(P, C4')$ és a $^3J(P, C2')$ vicinális csatolási állandókkal. A $\Delta J = ^3J(P, C4') - ^3J(P, C2')$ érték egyértelműen korrelál a transz vagy a gauche konformerek dominanciájával az adott konformációs egyensúlyi elegyben. A pozitív ΔJ értékek az ϵ^t (transz) míg a negatív értékek az ϵ^g (gauche) konformer túlsúlyát jelzik. Ezenfelül a *P*-diasztereomerek ΔJ értékei jellemzőek az abszolút *P*-konfigurációra is.

Doktori kutatásaim során új 5-szubsztituált pirimidin bázisokat tartalmazó peptid-nukleinsav monomer származékok szintézisével (a), valamint P-irális mononukleotidok szintézisével és vizsgálatával foglalkoztam (b).

a) A PNS-DNS de különösen a PNS-RNS duplexek stabilitása nagyobb, mint megfelelő DNS hasonmásoké így a DNS-ben már kipróbált valamint a még ismeretlen hatású 5-heteroaril ill. alkinil szubsztituensek beépítése homogén PNS-be várhatólag hasonló vagy még nagyobb mértékű T_m növekedést eredményezhet.

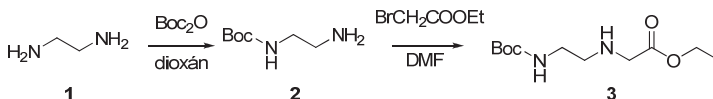
Doktori munkám célja: Olyan 5-aril ill. 5-alkinil szubsztituensek beépítése uracil PNS monomerbe, amelyek eddig még DNS módosításként sem fordultak elő. Ugyanakkor néhány már ismert, DNS-ben kipróbált, és eltérő T_m növelő hatással rendelkező analóg (5-(1-propinil)-, 5-(2-tienil)-uracil) beépítése is indokolt a korábbi DNS próbákkal történő összehasonlítás miatt annak kiderítése céljából, hogy ezek a PNS-ben is hasonló mértékű vagy esetleg eltérő ΔT_m /módosítás értékeket adnak-e.

b) A különböző P(III) származékok (foszfit triészterek, foszforamiditek, stb.) oxidációja a megfelelő P(V) vegyületekké igen sokféle oxidálószer alkalmazásával változatos módon valósítható meg, és ez alapvetően meghatározza a szóban forgó reakciók sztereokémiáját is

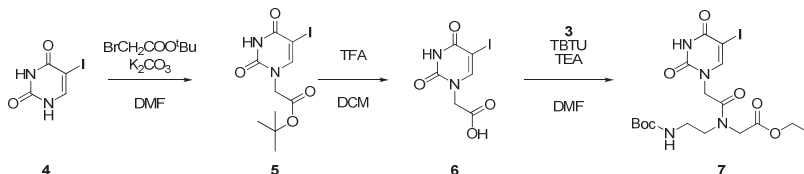
Doktori munkám célja: Különböző, a *P*-atomhoz kettős kötéssel kapcsolódó heteroatomok (O, S, és Se) hatásának vizsgálata a konformációs egyensúlyra. Mivel az említett heteroatomok mérete és elektronegativitása jelentős mértékben különbözik, ez várhatólag befolyásolja az egyes izomerek ΔJ értékei közötti különbséget is. Az említett NMR paraméterek tanulmányozásán kívül a *P*-izomerek kromatográfiás (normál és reverz fázisú HPLC) tulajdonságainak vizsgálatát is célul tűztam ki az abszolút *P*-konfiguráció és a t_R értékek közötti esetleges korreláció megállapítása végett.

Eredmények és következtetések:

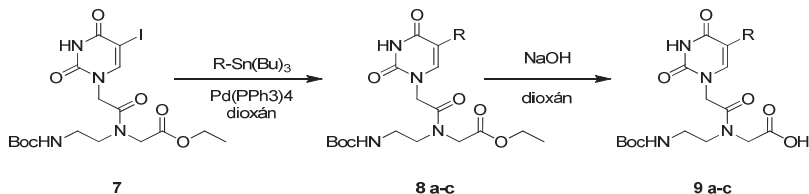
1. A peptid-nukleinsavak szintézisének kulcsintermedijere az etil-*N*-(2-Boc-aminoetil)-glicinát (Boc-gerinc) (3). Ennek szintézisére az irodalomból ismertnél jobb és hatékonyabb eljárást dolgoztam ki. A köztterméket (2) rutinszerűen végezhető módszerekkel tisztán izoláltam. Ezáltal a végtermék kromatográfiás tisztítása kényelmesebb és a reakció hozama is növelhető.



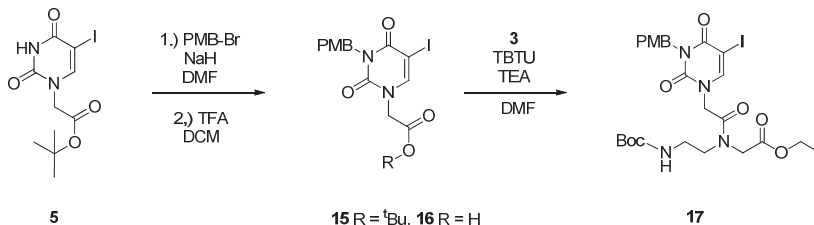
2. 5-jód-uracilból (4) kiindulva három lépésben előállítottam az 5-jód-uracil PNS monomert (7), amely palládium-katalizált keresztkapcsolási reakciókban felhasználható és ezáltal számos új analóg állítható elő.



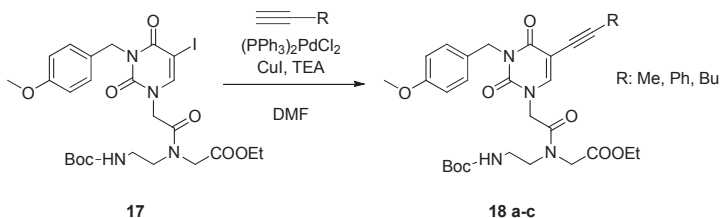
3. Aril-tributil-sztannán vegyületeket kapcsoltam Stille reakcióval az 5-jód-uracil PNS monomerhez. Így új 5-(2-furanil)- 5-(2-tienil)-, az és az 5-fenil-uracil PNS monomereket állítottam elő.



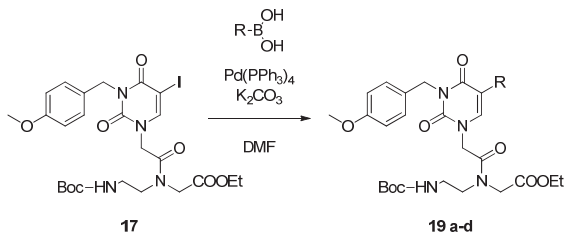
4. Az 5-jód-uracil PNS monomer a nem alkalmazható eredményesen a Suzuki kapcsolások során, míg a Sonogashira kapcsolásokban furano[2,3-d]-pirimidin gyűrűs melléktermékek is képződnek. A probléma kiküszöbölésére laktám-védett jódvegyületet terveztem, amely a Pd-katalizált kapcsolások körülményei között stabil.



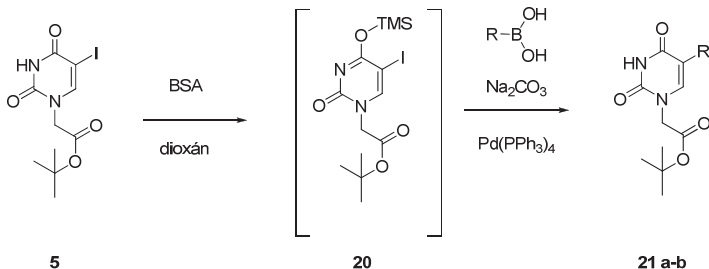
5. A Sonogashira kapcsolások a 3-PMB-5-jód-uracil PNS monomer, mint kiindulási anyag, alkalmazásakor közel kvantitatív hozammal valósíthatók meg. Előállítottam az új, védett 5-(1-propinil)-, 5-feniletinil- és 5-(1-hexin-1-il)-uracil PNS monomereket.



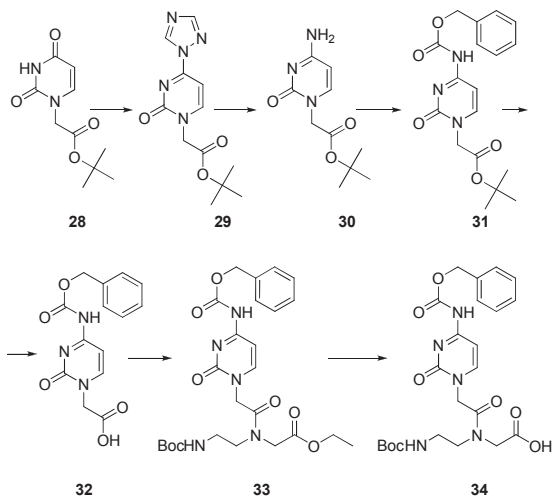
6. A boronsavak könnyű hozzáférhetősége és nagy tárháza miatt a Suzuki kapcsolás kiválóan alkalmas nagyszámú aril-analógok szintézisére. A 3-PMB-5-jód-uracil PNS monomeren sikeres kapcsolási reakciókat hajtottam végre különböző aril-boronsavakkal és így új, N³-PMB-védett 5-(2-tienil)-, 5-(4-bifenil)-, 5-(tianaftén-2-il)- és az 5-(4-dimetilaminofenil)-uracil PNS monomereket állítottam elő. A boronsavak helyett boronsav-pinakolésztereket alkalmazva a konverzió kb. 10 %-kal növelhető.



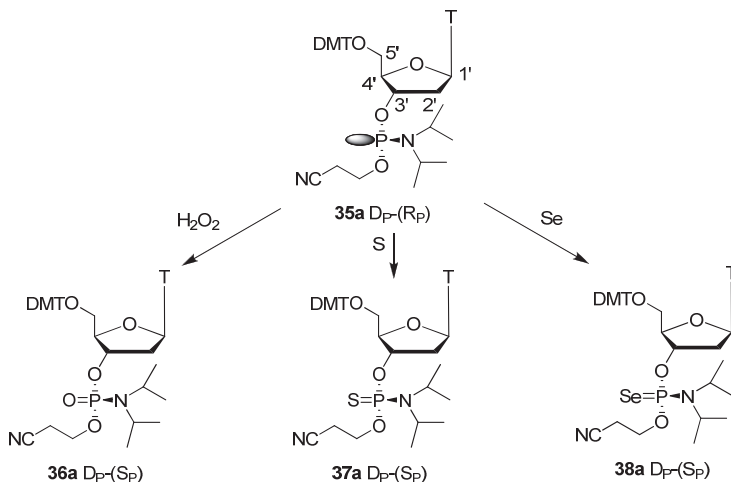
7. Mivel a PMB-csoport szelektív eltávolítása nem problémamentes **ezért** módszert dolgoztam ki *in situ* szililezéssel az 5-jód uracil származékok Suzuki kapcsolására.



8. A citozin PNS monomer előállítására új eljárást dolgoztam ki. A szakirodalomban leírt triazolil származékon keresztüli uridin – citidin átalakítást alkilezett uracilon is sikerrel alkalmaztam.



9. Az 5'-dimetoxitritil-timidin-3'-O-[O-(2-cianoetil)-*N,N*-diizopropil]foszforamidit (T-CED) tiszta *D_P,R_P*- és *L_P,S_P*-diasztereomerjeit H₂O₂-dal, elemi kénnel ill. szelénnel oxidálva gyakorlatilag kvantitatív hozamokkal izoláltam a megfelelő P(V) vegyületeket. Az NMR és kromatográfiás analízisek szerint a reakciók minden esetben kemo- és sztereospecifikusak voltak és a *P*-konfiguráció retenciójával játszódtak le.



10. A *P*-királis mono- és dinukleotidokkal kapcsolatos korábbi NMR vizsgálatainkkal összhangban megállapítottam, hogy a ΔJ ($= {}^3J(P, C4') - {}^3J(P, C2')$) értékek a preparált új analógok esetében is jellemzőek a *P*-konfigurációra. Eszerint a negatív ΔJ -k az L_P míg a pozitív értékek a D_P abszolút konfigurációval rendelkező izomerekre jellemzőek. Jelen adatok szerint ez a hozzárendelés a P(III) vegyületekre is érvényesnek bizonyult ami NOE mérésekkel megerősítve a jövőben alkalmas módszer lehet más királis foszfitok abszolút *P*-konfigurációjának meghatározására is.

11. A normál és különösen a reverz fázisú HPLC analízisek alapján megállapítottam, hogy a foszforatomhoz kettős kötással kapcsolódó heteroatomok elektronegativitása és a retenciós idők között egyértelmű összefüggés áll fenn. Az RP-HPLC-vel talált mobilitási sorrend: $(P=O) > (P=S) > (P=Se) > (\text{nemkötő elektronpár})$ megfelel a várakozásnak. Az egyes izomerpárokon belül, a ΔJ értékekhez hasonlóan, a HPLC profilok alapján is egyértelmű korreláció van a retenciós idők és az abszolút *P*-konfiguráció között.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Gacs-Baitz, E.; **Sipos, F.**; Egyed, E.; Sági G.: „Synthesis and structural study of variously oxidized diastereomeric 5'-dimethoxytrityl-thymidine-3'-O-[O-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropyl]-phosphoramidite derivatives. Comparison of the effects of the P=O, P=S, and P=Se Functions on the NMR spectral and Chromatographic Properties”
Chirality **2008**, 21(7). 663-685.

Sipos, F.; Sági, G.: „Synthesis of new, base-modified PNA monomers”
Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids **2007**, 26 (6-7), 681-685.

Sipos, F.; Sági, G.: „Synthesis of 5-substituted-uracil PNA monomers by Pd-catalyzed cross-couplings”
Journal of Peptide Science 12: 137-137 Suppl. S **2006**

Poszter előadások:

Sipos Ferenc, Sági Gyula: PNS monomerek szintézise Pd-katalizált keresztkapcsolások alkalmazásával. Vegyészkonferencia 2007, Sopron, 2007. május 29. - június 1

Ferenc Sipos, Gyula Sági : Synthesis of 5-substituted-uracil PNA monomers by Pd-catalyzed cross-couplings, 29th European Peptide Symposium, Gdansk, Poland, September 3-8, 2006

Ferenc Sipos, Gyula Sági, Zoltán Bajor: Synthesis of new, base-modified PNA monomers. XVII. International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids, Bern, Svájc, September 3-8, 2006

Ferenc Sipos, Gyula Sági: Synthesis of PNA monomers containing 5-substituted-uracil bases. 13th FECHM Conference, Heterocycles in Bioorganic Chemistry, Sopron, Hungary, May 28-31, 2006

Sipos Ferenc, Sági Gyula: Új peptid-nukleinsav monomerek szintézise. Vegyészkonferencia 2005, Hajdúszoboszló, 2005. június 28-30.

